

PREPARATION OF ANTIBIOTIC SUBSTANCE* SISOMICIN

Publication number: JP55156593 (A)

Publication date: 1980-12-05

Inventor(s): FUJI TADYO; SATOI SHIYUZOU; MUTOO NAOKI; KODAMA AKIRA; KOTANI MASARU +

Applicant(s): TOYO JOZO KK +

Classification:

- International: A61K35/74; A61P31/04; C12P1/06; C12R1/01; A61K35/66;
A61P31/00; C12P1/06; (IPC1-7): A61K35/74; C12P1/06;
C12R1/01

- European:

Application number: JP19790060022 19790515

Priority number(s): JP19790060022 19790515

Also published as: JP61023896 (B) JP1355900 (C)

Abstract of JP 66166693 (A)

PURPOSE: To prepare an antibiotic substance, sisomicin, by culturing sisomicin-producing fungi belonging to *Dactylosporangium* genus. CONSTITUTION: Fungi capable of producing an antibiotic substance, sisomicin, and belonging to *Dactylosporangium* genus, e.g. *Dactylosporangium thailandense* G367, are cultured in a conventional cultivation medium at 25-35 deg.C for 100-200h under aeration, and after adjusting the pH of the cultured medium to acidic range, the medium is neutralized and filtered to obtain the filtrate of the cultivation products. The filtrate is treated with an anion exchange resin, the adsorbed active substance is eluted with 2N aq. ammonia, and the elute is concentrated, adjusted on pH, and treated with an anion exchange resin. The adsorbed material is eluted with aq. ammonia having concentration gradient extending over 0 and 0.35N, and the active fraction is concentrated under reduced pressure, and freeze-dried to obtain the objective antibiotic substance, sisomicin.

Data supplied from the espacenet database — Worldwide

⑨ 日本国特許庁 (JP) ⑩ 特許出願公開
 ⑪ 公開特許公報 (A) 昭55—156593

5) Int. Cl. ³ C 12 P 1/06 # A 61 K 35/74 C 12 R 1/01	識別記号 ADZ	序内整理番号 6760-4B 6617-4C	⑫ 公開 昭和55年(1980)12月5日
			発明の数 1 審査請求 未請求

(全 7 頁)

⑬ 抗生物質シソミシンの製造方法

⑭ 特 願 昭54-60022
 ⑮ 出 願 昭54(1979)5月15日
 ⑯ 発明者 藤井忠代
 三島市光ヶ丘15の4
 ⑰ 発明者 黒井秀三
 静岡県田方郡函南町柏谷1277の
 28
 ⑱ 発明者 武藤直紀

静岡県田方郡大仁町三福685
 ⑲ 発明者 児玉章
 静岡県田方郡函南町平井1900の
 3
 ⑳ 発明者 小谷勝
 静岡県田方郡大仁町田京727の
 3
 ㉑ 出願人 東洋醸造株式会社
 静岡県田方郡大仁町三福632の
 1

明細書

I. 発明の名称

抗生物質シソミシンの製造方法

II. 前件請求の範囲

① タクテロスマゼランフウム属に属する抗生物質シソミシン生産菌を培地に培養し、その培養物より抗生物質シソミシンを採取することを特徴とする抗生物質シソミシンの製造方法。

② タクテロスマゼランフウム属に属する抗生物質シソミシン生産菌が、アグサラコスボランジウム・タリカンゲンセラガルミナフである酵母培养の範囲第1段記載の抗生物質シソミシンの製造方法。

III. 発明の詳細な説明

本発明は、抗生物質シソミシンの生産を製造方法に關する。

従来より抗生物質シソミシンの生産菌としては、
 ① クロノメボラ・イシエンシイア (*Micromonospora ishiensis* (特公昭49-15594、
 国特許第4009528号))、
 ② クロノメボラ・グリセア (*Micromonospora grisea* (特許昭48-

-52791号))、ミクロメノスボラ・ジオネシス (*Micromonospora gionensis* (特許昭49-56895号、米国米特第4801209号))、
 クロノメボラ・ベリエクス・ニグレセンス (*Micromonospora berleyi nigrenescens* (特許昭49-68778号、J. Antibiot. 39: 945 (1977))) が知られていた。このように、抗生物質シソミシン生産菌はすべてミクロメボラ属 (*Micromonospora*)に属するものであり、その形態的特徴は基生菌アビーリー管づけ子を形成するものであり、さらにはタクテロスマゼランフウム属は、
 クロノメボラ科 (*Micromonosporaceae*)に属する (*Bergey's manual of determination bacteriology* 第8版 (1974)) ものであつた。

本発明者は、静岡県富士市の蛇虫山より分離した放酵素性乳酸菌が抗生物質シソミシンを产生することを見い出し、検証する通り、放酵素G5-67がタクテロスマゼランフウム属 (*Decticinoprenium*)に属するもので、その形態的特徴は基生菌系に應

子のうを落生し、胎子のうちに棘毛を有する胎子を形成するもので、さらばこのダクテロスチランジウム属はアクタノープラヌス科 (Actinoplaneaceae) に属するもので、従来のミクロモノスボク属とは分類学上、明らかに科の階級での相違が認められるが生物質シンシンの新族を生産すであることを見い出した。

上記苦酸素 G-3-6-7 の典型的および類似的觀察に基く各種培地上における報告は、次の通りであつた。

(I) 形態的性状

シンゾウカルシウム寒天培地 [Bant. Rev. 2-1 : 1 (1957)] 上、30℃、3-7日開始発育し、根糸した原見四次の通りである。

菌生菌糸は曲筋糸または屈曲状で、分枝をなし、伸長し、分枝はせず、直徑 6.5 × 0.8 μ であり、菌糸部は胞子しない。

基性菌糸に、大きさ 5 × 2.0 × 2.0 × 2.5 μ の球状または球円状物体の発生が、寒天培地中長短の丸状部でみられる。

- 3 -

基生菌糸より細かい菌子のうが多生じ、菌子のうは指形で、寒天培地表面に、1個または群状で形成する。菌子のうの大きさは、1.0 × 1.5 × 4.0 ～ 6.5 μ で、中に 3 ～ 4 個の胎子がたてに一列に入っている。

菌子は水中で運動性があり、先は錐形、錐円形または近錐形を呈し、大きさは 1.0 ～ 1.5 × 1.5 ～ 2.5 μ であり、極性で房状の棘毛を有している。
[II] ジアミノピメリリン酸組成

全固体分析によるジアミノピメリリン酸は、メソーテ型およびメゾー型より R m 値の低いもの (R m moving diaminopimelic acid) が検出された。
[III] 各種培地上における生育状態等

各種培地上で、30℃、14 日開始発育し、観察した所見は次表の通りであり、オート・ミール寒天培地上で未発育の菌糸部がわずかに形成される以外、菌糸条の形成は認められず、また胎子のうはシンゾウカルシウム寒天培地上で良好。直接寒天培地 (J. gold Microbiol. 5-6 : 295 (1968)) 上で、中程度であり、その他の培地上

- 4 -

ではわずか、またほとんど形成されなかつた。

なお、色の要介は、カラ…、ヘーベル…、マーブル (Color Harmony Manual) 第 4 版 1958 年 (Container Corporation of America) による色の分類に従つたものである。

各類植物上之寄生蟲

地	生育	葉生葉の色	可溶性色素
シルクロース・硫酸鉄素天培地 (ワタツマツン培地No.1)等	中程度ないし不良	アブリコット(Apricot(4ic))ないしオレンジ (Dasty Orange(4ic))	なし
グルコース・アスパラゲン素天培地 (ワタツマツン培地No.2)等	不良	ライト・イエロー(Light Yellow(4ic)) (3ic)ないしアブリコット(A4ic)	△
アリセリン・アスパラゲン素天培地 (1SP培地5)等	僅少ないし不良	無色ないしライト・メン・イエロー(Light Men-tion Yellow(3ea))	△
スマーチ・無機塩等々培地 (1SP培地4)等	中程度ないし良好	ベセット・オレンジ(Russet Orange(4ic))ないし ダズベー・オレンジ(4ic)	△
チロシン素天培地 (1SP培地7)等	僅少ないし不良	アブリコット(Apricot(4ic))ないしペール・オクタ- カル・オレンジ(Pale Octal Orange(4ic))	△
オニシ・ミール素天培地 (1SP培地3)等	中程度ないし良好	オレンジ・ルスト(Orange Rust(4pe))ないし メセントオレンジ(Ruscent Orange(4pe))	△
シーバス・ホウ酸水素等々素天培地 (1SP培地2)等	△	メイプル(Maple(4ic))ないしルガシジ・タン (Lugangji Tan(4ue))	メイプル(4ic)ないしライト・ ゾラウン(Light Brown (4ng))
リンド醣カルシウム素天培地	不良	無色	なし
供養素天培地 (ワタツマツン培地No.1)等	僅少	△	△

6

ペニシル素天池地 (ワツクサン・塘蛇地 50) 東	中 郡 康 いし良 紅	マイアル(41a)ないしメガフ・タン(41e)	マイアル(41a)ないしライト・ブラウン(41g)
エマーソン素天池地 (ワツクサン・塘蛇地 26) 東	中 郡 康	バスクル・オレンジ(41c)ないしメイプル(41a)	マイアル(41a)
ハイカー・トレッカーズ素天池地 (ワツクサン・塘蛇地 52) 東	中 郡 康 いし良 紅	シナモン[Cinnamon(51e)]ないしマイアル(41a)	マイアル(41a)ないしライト・スライ ク・ブッシュ[Light Slender Bushy Brown(41a)]
グルコース・イースト・エヌ素天池地 (ワツクサン・塘蛇地 62) 東	中 郡 康	メロン・イエロー[Melon Yellow(5ga)]	青 し
ハーフトン・イースト・エヌ素天池地 (15P 塘蛇地 1) 東	鈴 少	無 色	"
士 士 植素天池地	僅少ないし不良	"	"
ジャガイモ片 (ワツクサン・塘蛇地 40) 東	中 郡 康	タイルレッド[Tile Red(5na)]ないしコッペ ル[Copper(5in)]	"
ジャガイモ片・浜駅カハヌミ	"	"	"
キンメンツ	僅 少	無 色	"

* Wakeman, S. A. "The Actinomycetes," Vol. 2, Woods 1969 p327-334 Williams & Wilkins Co.
 * Inter. & Syst. 16:515-540 (1966)

*** Antimicrob Agents and Chemother. 1963. p. 116 ~ 124

(IV) 生理的性状

生理的性状は下記の通りである。

1.) 菌糞菌の食性

炭素源	P & G	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	糖蜜	L-ラムノース	D-リボース	L-フルゴース	D-フルピロース
D-アラビノース	土	+		+	—	—	—
L-アラビノース	+	+		—	—	—	—
D-ガクトース	+	+		—	—	—	—
D-ガラクトース	+	+		—	—	—	—
D-グルコース	+	+		—	—	—	—
グリセロール	—	—		—	—	—	—
L-イノントール	—	—		—	—	—	—
D-マンノース	+	+		—	—	—	—
D-フランクトール	+	+		—	—	—	—
D-メリビオース	+	+		—	—	—	—
β -ラクトース	+	土		—	—	—	—
ズルシトース	—	—		—	—	—	—
D-トレハロース	+	+		—	—	—	—
D-セロビオース	+	+		—	—	—	—
メレジトース	+	+		—	—	—	—
タフイノース	+	—		—	—	—	—

- 8 -

+ : 食性、- : 異能性、— : 食性

※: プリドハム・ゴツリーヴの無機培地

参考: Inter. J. Syst. Bact. 23: 24 日 - 2

47 (1971) によるルエドソンの有機
培地

2.) 生育基質範囲: 2.0 ~ 4.0 %

3.) 脂肪牛乳: オブト化および脂肪とともに耐
性

- 9 -

4.) メチレン藍色菌の生成: 極性 (テクシンおよびペプチド・イーストエキス。歯科天培地上)

5.) スターチの加水分解: 食性

6.) セルロースの分解: 食性

7.) カゼインの分解: 食性

8.) チョシンの分解: 食性

9.) イラテンの消化: 食性

10.) 硬化水素の生成: 弱い酸性

11.) 硝酸塩の還元: 等性

12.) 伸長PH: PH 5.5 ~ 9.0

上記の通り、本菌G 5-6-7の特徴としては、基
生菌として推進の態子のうを產生し、態子のう中に胞
子がたてに一向にならび、胞子に周囲の鞭毛を
有していることにある。

このように、胞子のうを形成し、その中に鞭毛
を有する胞子を形成するものは、アカネアラオ
ス科 (Acanthopinnaceae) に属するものであつて、
胞子のうが形成され、その中に中に一向に胞子が
形成されるものは、ダクテロスピランジウム属に属
する。

古くは、本菌G 5-6-7は有機培地上で、漆黒菌
類が褐色ないし褐色を呈し、褐色の可溶性色素
を有することより、タクテリスボランジウム・タ
イランデンセ (Dactylosporangium thailandense) [Arch. Microbiol. 58: 42-
52 (1967)] に属するものと同定した。

よつて、本菌G 5-6-7を、ダクテリスボランジ
ウム・タイランデンセ G 5-6-7と命名したもの
であつて、また本菌は正義診療院微生物研究部
研究所「正義診療院第4040号」として登
録したものである。

本発明は上記の如見に示いて実施されたもので、
ダクテリスボランジウム属に属する微生物質シ
ミン生産菌を培養し、その培養液より純
生物質シミンを採取することを特徴とする純
生物質シミンの製造方法である。

次いで、本発明の微生物質シミン (以下、
シミンという) 制造するにあつて例示すれば、
上記のダクテリスボランジウム属に属するシミ
ン生産菌を適度の培养液に使用する培地

- 10 -

- 11 -

部分を含む培地にて好気的栽培をすることによつて得られる。培地としては、樹脂培地または液体培地が用いられるが、特に大発生率のため長は液体培地、特に水性基質が適当である。

細胞の栄養源としては、該作物の培養液通常用いられるものが広く使用される。培养液としては同社販売の培養液を使用するのがよく、例えばグリコート、シクロロース、マルトース、スクーナー、デキストリン、モラクサなどが使用される。培养液としては利用可能な無機化合物であればよく、例えばコーン、ステアーリカー、大豆粉、糖蜜粉、小麦グルテン、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、アンモニウム塩、硝酸塩などが使用される。その他の、リン酸鈉、マグネシウム、カルシウム、カリウム、ナトリウム、コバルト、鉄、マンガンなどの培養が必要に見じて使用される。

培養温度は菌が発育し、シソミシンを生成する範囲内で適宜変更し得るが、特に弱ましくは25～35度である。培養時間は、条件によって多少

- 12 -

異なるが、通常100～200時間程度であつて、シソミシンが最高力強さ達する時期を見計つて培養を終らせるのがよい。

このよう式して得られたシソミシン生産菌の液体培養の培養物中にいて、シソミシンは液体部分に大部分存在する。

次いでこのシソミシン生産菌の培養液からシソミシンを採取するのであるが、シソミシン株が宿主細胞の脂溶性アミノ酸化合物であることを利用して分離精製を行なうことが簡便である。すなはち生産されたシソミシンはパチルス・ズアトリス脱C-12-17を被膜菌として、通常の寒天培地により活性区分の確認、および定量を行なつたものである。

シソミシンの分離精製手段の一例を示すと次の通りである。すなはちシソミシン生産菌を前段の如く培養して得られる培養液から固形分を除きして培養液を得るのであるが、シソミシンがアミノ酸化合物であるためにその培養液のpHを一日毎に調節し、これを中和して芦井してその培養液を採り得ることが最もしく、次いでこの培養液

- 13 -

を陽イオン交換樹脂例えばアンバータイト I R C-5B (NH_4^+ 型) のカラムにチャージせしめて脱脂せしめ、これにより脂溶性物質を2Nアノモニア水にて溶出せしめ、さらにその溶出液を濃縮した後、そのロドを脱脂し、陽イオン交換樹脂例えばCM-ヒファデックスC-25 (NH_4^+ 型) のカラムにチャージせしめて脱脂せしめ、0～5.5%の酢酸乙酸をもたらしたアンモニア水にて溶出せしめ。その溶出液を稀め、これを該柱洗浄し、洗浄乾燥することによりシソミシンの精製白色粉末を蒸留塔の器にて得られる。またこの確にして得られるシソミシンは薄層クロマトグラフィーにて單一スポットを示すものであることが簡便にわし得る。

このようにして得られた本発明のシソミシンの物理化学的性質を示すすれば次の通りであり。公知のミクロセレニムセラシテ属するシソミシン生産菌の產生する公知化合物なるシソミシンと一緒にした。

(1) 分子量

- 74 -

4.4.7 (マススペクトルより)

(1) 元素分析

C = 49.59%, H = 8.03%, N = 14.75%

(2) 紅外光吸収

[λ] $25^{\circ} \text{C} = 1.84^{\circ}$ ($C = 0.5$, H_2O)

(3) 紫外外部吸収スペクトル

212～400nmの領域において、吸収極大はなし。

(4) 核磁性

東洋島綿、メタノールに溶解、クロロホルムに溶解、酢酸エチル、アセトン、ベンゼンに不溶。

(5) 生色反応

レミニュ反応、エンヒドリン反応

強口反応、堿化第一銅反応、モーリクシル反応

(6) 色素：シリカゲル (メルツ桂酸 、 キーゼルゲル 60)

クロロホルム：メタノール：濃アンモニア水 = 1:1:1 の下層

$R_f = 0.44$

同族糖基の区別

- 15 -

增基錄

◎ 楊曉波 / 文

メタフィロコバクス・アケラレスATTC64558F	≤0.2
メタシイムシカス・アクリシスM527	≤0.2
ストラフィロコウカス・エピドレミディスクsp-a1-1≤0.2	
アントシアントコカス・ペオガヌス種々	1.6
マルシナ・マラテアTCC5341	5.6
コリキバタナリウム・ジフチニアPWB	≤0.2
エシエリヒア・セリ-N1HJ	0.1
シトロバクター・フロインダイIGRN546	0.1
ケラレピジア・ニユカモウアATTC100531	0.1
サルヒカラ・エンタリテライディス・ゲルルトモリ	0.1
シゲラ・ナネモニミ	0.1
エンサロバクター・アエロカオスS655	0.
シユードモナス・スルヤーナM4561	0.1
これらの薬素より、本病例にて得られた化合物 尿細胞の利尿作用のシグニシント同一物質であ る可能性がある。	

次に本発明の実験例を挙げて具体的に説明する。
【実験例】本発明の効果を確認するため、

はなじ

天祐四

ゲキストリソ 1%、グルコース：馬、カゼイン水解物 0.5%、酵母エキス 0.5%、炭酸カルシウム 0.7%を含有する培地（P H 7.9） \pm 0.0 C₆H₁₂を 5.0 g 每容三角フタコロに分取し、1 日 2 回、各 2 分開放加熱殺菌した。本培養 1 日日本、各カクテラロスオランジウム・タイランアンセロ 3.67 殻の斜面培養瓶よりの - 白金耳を移植し、3 日後、1.2 日時弱膜炎発生した。次いでこれを上記と同一組成の加熱殺菌した培地 2.0 g を含有する 3.0 g 容シヤーフア・マクターブ器移し、5.0 ℓ、7.2 時間、30 G rpm、恒温 20 ℓ の無菌空気の条件下で通気膜培養をした。次いでゲキストリソ 5%、グルコース 0.5%、脱脂大豆粉 5%、炭酸カルシウム 0.7%、炭酸コハルト 1.5 g p.p. を含有する細胞培養した培地（P H 7.2 \pm 0.0 C₆H₁₂を 2.5 g 每容タングルに上記の宿葉物 1.0 g を移植し、5.0 ℓ、1.2 時間、2.50 G rpm、恒温 20 ℓ の無菌空気の条件下通気膜培養をし、

卷 12

無外物約 1 9 日之多福女。

次いで、実施例 2 の如くして、その結果より
シグニシカンを分離精製するものである。

实验例 2

実験例1で得られた培養液を、12N硫酸水溶液でPH7.0に調節し、3分間攪拌した後、濃アンモニウム水でPH7.0にて調節し、さらだこれに硫酸鈎酸鉄としてペーライト（商標名：4号）を加えて計滴定し、次いで得られる培養液を、アンペラメータ（RC-5B（ローム、アンダ、ハーブ社製））（400A）を充電したカラム式オキシゲン・オフセット法で、2Nアンモニア水を20mLにて滴がせしめ、その全量出荷を待、これを1日目までの除菌操作。

次いでどの濃縮液を 6 N 硫酸水溶液にて pH 7.0 に調節し、これを、C.M.一ホバゲンタス G-25 (アマルシン・クライシ・ケミカル社製) 1 NH₄⁺ 構造の CBH を充填したカラム (直径 4 cm) にチャージして活性物質を溶離せしめた。その洗浄液を、水を加え、ローラー式均一化器にて均一化した。

をさせたアンモニア水 5 L 比より將出せしめ、濾出液を 2 日以上分離した。各分離について、クロロホルム・メタノール : 28 % アンモニアアボル : 1 : 1 : 1 の下層を無酸性浴槽とした薄層クロマトグラフィーを行ない、ニンヒドリン発色により目的物を確認した。その結果、第 2 1 0 濃分より 2 2 8 濃分がシミシンのみを含有したものであつた。次いでこの濃分を回収、合せて後述精純してニンヒドリン染色でシミシン : 2.1 % を得た。

製造出発人 萬葉醸造株式会社
販賣通 伊藤喜一郎

三五

- 19 -

手 帳 検 正 書

昭和55年6月 / 日

特許庁長官 用 原 龍 雄 様 敬

1. 事件の表示

昭和55年6月特許審査60022号

2. 発明の名称

微生物質レゾミシンの製造方法

3. 被害とする者

事件との関係 特許出願人

住所 昭和興業株式会社 仁川三浦632の1

名称 東洋薬品株式会社

代表者 伊東富士一郎

4. 約定命令の日付

自記

5. 約定の対象

明細書の発明の詳細な説明の特許登録

6. 約定の内容

明細書第3頁第3行ヘタ行の

「ミクロモノスボラ・パリエタス・ニグレツセンス」を
「ミクロモノスボラ・パリエタス・ニグレツセンス」と訂正する

修正メモ b₁

「ミクロモノスボラ・パリエタス・ニグレツセンス」と訂正する

同第2頁第5行の

「Micromonospora var. nigrescens」を

「Micromonospora purpurea var. nigrescens」
と訂正する

同第2頁第7行の

「diaminopilelliae」を

「diaminopilella」と訂正する

同第2頁第12行の

「J. gen. Microbiol.」を

「J. gen. Microbiol.」と訂正する

同第2頁第16行の

「セファゲラクタリ」を

「セファゲラクタメリ」と訂正する